



食品科学

Food Science

ISSN 1002-6630, CN 11-2206/TS

《食品科学》网络首发论文

题目： 花椒精油对链脉佐菌素诱导的糖尿病小鼠糖代谢的影响
作者： 陆敏涛，任廷远，杨建，陆龙发，秦礼康
网络首发日期： 2020-11-23
引用格式： 陆敏涛，任廷远，杨建，陆龙发，秦礼康. 花椒精油对链脉佐菌素诱导的糖尿病小鼠糖代谢的影响. 食品科学.
<https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20201120.1509.085.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

花椒精油对链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠糖代谢的影响

陆敏涛¹, 任廷远^{*1,2,3}, 杨建⁴, 陆龙发⁴, 秦礼康¹

(1.贵州大学 酿酒与食品工程学院, 贵州 贵阳 550025; 2.贵州省农业生物工程重点实验室, 贵阳 550025; 3.贵州省农业科学院农业部 DUS 中心贵阳分中心, 贵州 贵阳 550006; 4.贵州玄德生物科技股份有限公司, 贵州 贵阳 550016)

摘要:目的 研究花椒精油对 1-型糖尿病机体糖代谢的影响及可能机制。方法 将 50 只健康雄性昆明小鼠(KM 小鼠)分为空白对照, 糖尿病模型, 花椒精油高剂量组 15 mg/(kg d), 中剂量组 9 mg/(kg d), 低剂量组 3 mg/(kg d), 每组 10 只。链脲佐菌素(STZ)诱导建立 1-型糖尿病模型。空白组和糖尿病模型组灌胃等剂量的大豆油, 给药 28 d 后, 检测血清胰岛素、糖化血清蛋白及糖化血红蛋白含量; 检测肌糖原和肝糖原含量; 应用实时荧光定量聚合酶链式反应测定肝脏磷酸肌醇 3 激酶(Phosphoinositide 3-kinase, *PI3K*)、蛋白激酶 B (protein kinase B, *PKB*)、葡萄糖转运子 2 (glucose transporter 2, *GLUT2*) 和葡萄糖转运子 4 (glucose transporter 4, *GLUT4*) mRNA 相对表达量; Western blot 检测肝脏 *PI3K*(p110)、*PKB* 和 p-*PKB* (Ser473) 的蛋白表达量。实验期间每周测量其血糖值及体重, 给药第 28d 后进行葡萄糖耐量测定。结果 与模型组相比, 剂量组的摄食量、饮水量、血糖值、血红蛋白与血清蛋白含量最高可下降分别为 38.91%、35.93%、28.6%、30.76%、37.29%, 胰岛素、肝糖原与肌糖原最高可提高分别为 22.56%、23.61%、149.75%; *PI3K*、*PKB*、*GLUT2*、*GLUT4* mRNA 相对表达量均显著($P < 0.05$)分别上调了 87.5%、53.4%、77.05%、133.3%; 高、中、低剂量组 *PI3K*(p110)蛋白表达量分别上调了 76.17%、71.54%和 62.61%, p-*PKB* (Ser473) 的蛋白表达量分别上调了 88.43%、85.96%和 73.19%。结论 花椒精油对 1-型糖尿病小鼠具有降糖效果, 其可能机制是激活 *PI3K*/*PKB* 途径, 使 *GLUT2*/4 移位, 促进细胞对葡萄糖的吸收和利用。

关键词: 花椒精油; 1-型糖尿病; 糖代谢

Effect of *Zanthoxylum* essential oil on glucose metabolism in diabetic mice induced by streptozotocin

LU Mintao¹, REN Tingyuan^{*1,2,3}, YANG Jian⁴, LU Longfa⁴, QIN Likang¹

(1.School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang, 550025, China; 2.College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 3.Guiyang Station for DUS Testing Center of New Plant Varieties of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China in Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China; 4. Guizhou Xuande Biotechnology Co., Ltd., Guiyang, 550016, China)

基金项目: 贵州省科技项目, 黔科合基础[2020]1Y431; 贵州省林业厅科技项目, 特林研 2020-010; 贵州省科技厅项目, 黔科合平台人才[2020]2105; 贵州省科技计划项目, 黔科合平台人才[2018]5781-50; 贵州大学引进人才科研项目, 贵大人基合字(2018)42号)

第一作者: 陆敏涛(1996-) (ORCID: 0000-0003-0977-4558), 女, 硕士研究生, 主要从事食品加工与安全研究; 邮箱: 1563022135@qq.com;

通信作者简介: 任廷远(1983-) (ORCID: 0000-0002-3251-268X), 男, 博士研究生, 副教授, 主要从事食品化学与营养研究; 邮箱: tyren@gzu.cn;

Abstract: Objective the effect of *Zanthoxylum* essential oil on glucose metabolism in type 1 diabetic mice and its possible mechanism. **Methods** 50 healthy Kunming mice were randomly divided into 5 groups, including blank control group, diabetic model group, high-dose group 15 mg/(kg d), middle-dose group 9 mg/(kg d) and low-dose group 3 mg/(kg d) of *Zanthoxylum* essential oil in soybean oil solution. Type 1 diabetes model was constructed by streptozotocin (STZ) induction, the blank control group and diabetic model group were orally treated with same dose of soybean oil. After 28 days of administration, the contents of insulin, glycosylated serum protein (GSP) and glycosylated hemoglobin (GHb) were determined in serum. Respectively, muscle glycogen and liver glycogen levels were determined. The mRNA relative expression of *PI3K*, *PKB* and *GLUT2* genes in liver and *GLUT4* gene in skeletal muscle was detected by qRT-PCR; abundance of the liver proteins PI3K (p110), PKB and its phosphorylation level (p-PKB) was determined by Western blot. Blood glucose and body weight were measured weekly during the experiment, and glucose tolerance was measured at the 28th day of administration. **Results** Compared with the model group, the food intake, drinking water, blood glucose, hemoglobin and serum protein contents in the dose group decreased by 38.91%, 35.93%, 28.6%, 30.76% and 37.29% respectively. Insulin, liver glycogen and muscle glycogen can be increased by 22.56%, 23.61% and 149.75% respectively. The relative expressions of *PI3K*, *PKB*, *GLUT2* and *GLUT4* mRNA were significantly increased ($P < 0.05$) by 87.5%, 53.4%, 77.05% and 133.3%, respectively, and there was a dose-effect relationship. Furthermore, the expression of protein PI3K(p110) was up-regulated by 76.17%, 71.54% and 62.61%; phosphorylation level (p-PKB) of PKB was up-regulated by 88.43%, 85.96% and 73.19% in high, medium and low dose groups, respectively. **Conclusion** *Zanthoxylum* essential oil has hypoglycemic effect on type 1 diabetic mice. The possible mechanism is that it activated the PI3K/PKB pathway, translocated GLUT2/4, and promoted the glucose absorption and utilization.

Keywords: *Zanthoxylum* essential oil, type 1 diabetes mellitus, glucose metabolism

中图分类号: R285.5 文献标志码: A

DOI : 10.7506/spkx1002-6630-20200424-321

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种以高血糖为特征的代谢紊乱性疾病群^[1]。随着生活水平的提高,糖尿病的发病几率越来越高,据估计,2045年,将有近7亿糖尿病患者,糖尿病生物体中长期存在的高血糖可对人体机能产生巨大的损害,糖尿病的防治迫在眉睫^[2]。目前对于糖尿病的治疗措施一般采用注射胰岛素同时口服合成药的方法,常用的降糖药物虽然具有较好的效果,但是,长期使用药物会对身体的正常生理功能产生严重的不良影响^[3]。因此,研究预防糖尿病的新型药物或辅料显得很有必要,来源于食品或药食物中的天然活性成分因其健康、安全、作用温和等特点而备受人们的青睐。

花椒(*Zanthoxylum bungeanum Maxim*)是指植物花椒树的成熟果皮,花椒树属芸香科(*Rutaceae*)花椒属(*Zanthoxylum*)^[4],主要分布于四川、重庆、河北、湖南、吉林以及东南亚一些国家。据《诗经》记载,我们的祖先早在两千多年就已经开始使用花椒^[5],目前全世界花椒种类大约为250余种,而我国花椒种类高达50余种,约占全世界的五分之一,从种植面积和数量来看,我国是花椒产业的大国^[6]。花椒是我国传统调味品之一,含挥发油等多种成分^[7],具杀菌、消炎、抗肿瘤、抗氧化、抗溃疡、驱虫抗寒等多种功能^[8],是医药和食品的原料^[9,10],它具有极高的药理性能和广泛的应用范围。

目前,关于花椒对糖尿病的治疗,人们主要对花椒麻素的降糖降脂方面进行了大量研究,花椒麻素是产生麻味风味的主要来源^[11,12], You YM^[13]等研究表明,花椒麻素具有降糖作用可能是通过上调肝脏中磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPCK)、葡萄糖激酶(glucokinase, GK)和葡萄糖-6-磷酸酶(gucose-6-phosphatase, G6Pase)的表达量以及修复受损的胰腺β细胞从而上调胰腺中胰十二指肠同源盒1(pancreatic-duodenal homeobox 1, PDX-1)、GK和GLUT2的mRNA水平和蛋白表达量而引起的。Ren TY^[14]等研究表明,花椒麻素对糖尿病大鼠的降糖机制是激活腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)信号通路,介导GLUT4从细胞质快速转运到细胞膜,达到降糖效果^[15]。陈朝军^[16]研究表明,花椒素和辣椒素能使大鼠体重增

加速率减慢,减轻大鼠的脂肪肝症状,对胆固醇代谢循环紊乱有一定的改善作用。游玉明^[17]等人研究发现花椒麻素有改善糖尿病导致的肠道菌群紊乱的作用,灌胃花椒麻素后,盲肠内容物中某些益生菌数量显著增加,而某些条件致病菌数量显著降低。现阶段对于花椒的研究甚多,但未见花椒精油治疗糖尿病的报道。然而,国内花椒的销售主要以鲜椒、干椒和低麻度花椒油等初级产品为主,而花椒的精深加工产品非常匮乏,这将阻碍花椒产业的可持续发展。因此,如何挖掘花椒的附加值,提高其经济效益,增加椒农收入,是企业、政府和相关科技人员急需解决的一大难题,而开展花椒精油的功能性评价,是解决花椒向精细化加工的又一条有效途径。

目前,花椒的功能的探究仍处于初步探索阶段,本实验选用不同浓度的花椒精油对链脲佐菌素诱导的1-型糖尿病小鼠模型进行灌胃试验,旨在探讨了花椒精油对1-型糖尿病小鼠糖代谢的影响及可能机制,有助于对花椒精油有更多的认识,为花椒精油的开发和利用提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

红花椒精油,由陕西韩城产大红袍花椒,经超临界CO₂萃取后,用分子蒸馏分离而得,由贵州玄德生物科技股份有限公司提供;昆明种雄性小鼠,SPF级,重22-24g,50只,由重庆腾鑫生物技术有限公司提供(合格证号:SCXK(渝)20120008);链脲佐菌素(STZ),美国sigma公司;DNA凝胶回收试剂盒,德国Qiagen公司;粪便DNA提取试剂盒,天根生化科技有限公司;荧光定量试剂盒;糖化血清蛋白(GSP)试剂盒、糖化血红蛋白(GHb)试剂盒、胰岛素(INS)酶联免疫分析试剂盒、肝糖原试剂盒,由南京建成生物科技股份有限公司提供;PI3K、PI3K(p110)、PKB和p-PKB(Ser473)抗体,由Abcam提供。

1.2 仪器与设备

L5S紫外-可见分光光度计,上海仪电分析仪器有限公司;SpectraMax190连续波长多功能酶标仪,美国Molecular Devices公司;H1-16KR高速冷冻离心机,湖南可成仪器设备有限公司;YH-A5003电子天平,五星衡器有限公司;血糖仪与配套血糖试纸,江苏鱼跃医疗设备股份有限公司;S1000梯度PCR仪,美国BIO-RAD公司;L5S紫外-可见光光度计,上海仪电分析仪器有限公司;Nano Drop 1000微量紫外分光光度,美国Thermo公司;Light Cycler Nano荧光定量PCR仪,美国罗氏公司;Powerpac蛋白电泳仪,美国Bio-Rad公司;Gel Doc XR凝胶成像系统,美国Bio-Rad公司;Trans-Blot Turbo蛋白转膜仪,美国Bio-Rad公司。

1.3 动物饲养与样品采集

动物实验过程严格遵循现行的贵州医科大学实验动物伦理委员会批准的相关法律法规进行(SYXK(黔)2018-0001)。体重18-22g,雄性昆明小鼠50只,分为空白组(n=10),模型组(n=40)。小鼠经过12h禁食,不禁水,一次性注射150mg/(kg·bw)STZ造模,造模期间自由摄食、饮水。建模后第3d,禁食10小时,然后尾尖采集血样,血糖仪测量空腹血糖值(FBG)。当FBG值高于11.10mmol/L时,则造模成功^[18],并筛选建模失败的小鼠。把40只建立模型的小鼠分为4组(n=10),即花椒精油高剂量15mg/(kg·d)、中剂量9mg/(kg·d)、低剂量3mg/(kg·d)和模型组,模型组和空白组灌胃等剂量的大豆油。饲养期间均自由摄食,自由饮水,每隔7d称量体重,根据体重(0.1ml/kg)来调整灌胃剂量。

各组小鼠连续灌胃28d后禁食不禁水12h,摘掉眼球取血完毕,断颈处死,小鼠在冰上迅速被解剖取其肝脏,并用冰冻的0.9%生理盐水漂洗干净(预先配好溶液灭菌后放置于4℃冰箱保存备用),使用吸水纸将肝脏表面的水分擦干,放入-80℃冰箱保存备用,测定时取出样品解冻后检测^[19]。

1.4 花椒精油的处理

为保证每只小鼠为等剂量灌胃(40g体重小鼠灌胃0.2ml剂量)。准确称取1.2g红花椒精油,加入400mL大豆油后,充分混匀,配制成3mg/ml花椒精油溶液,再取少量分别用大豆油稀释成1.8

mg/mL 和 0.6 mg/mL 的花椒精油溶液。分别用于高 (15 mg/mL)、中 (9 mg/mL)、低 (3 mg/mL) 剂量组的灌胃浓度, 空白组和模型组灌胃等剂量大豆油, 每 3 d 配一次, 于 4 °C 保存。

1.5 指标测定

1.5.1 血糖值的测定

在灌胃试剂后的第 0 d、7 d、14 d、21 d 和 28 d, 禁食不禁水 6 h, 使用血糖仪剪尾采血测定 FBG^[20]。

1.5.2 口服糖耐量测定

连续灌胃 28 d, 禁食不禁水 12 h, 根据 2.00 g/kg bw 灌胃葡萄糖溶液, 通过剪尾取血测量 0 h、0.5 h、1 h 和 2 h 时的血糖水平^[21], 观察各组小鼠血糖的变化情况。血糖曲线下面积 (AUC) 根据以下公式计算^[22]:

$$\text{AUC(hmmol/L)} = \frac{(0.5A + B + C + 0.5D)}{2}$$

式中: A、B、C 和 D 是灌胃葡萄糖溶液后 0、0.5、1 和 2 h 的血糖值。

1.5.3 小鼠脏器指数的测定^[23]

$$\text{脏器指数} = \frac{\text{器官重量}}{\text{体重}}$$

1.5.4 理化指标测定

糖化血红蛋白(GHb)、糖化血清蛋白(GSP)、胰岛素 (INS)、肝糖原与肌糖原的测定, 具体操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.6 肝脏及骨骼肌 mRNA 和蛋白表达量检测

从组织样品中提取总 RNA, 使用 Qiagen 提取并反转录得 cDNA, 使用紫外分光光度计测定 RNA 浓度。实时荧光定量聚合酶链反应用于检测相关基因的表达, 以 β -actin 为内参并采用 2^{- Δ Ct} 法计算各基因相对表达, 操作步骤如下^[24]: 总 RNA 提取→反转录及 cDNA 的合成与检测→荧光定量 PCR 检测。各基因的引物序列如表 1。蛋白表达量检测参考 Ren T 等^[14]方法进行。

表 1 引物序列和产品大小

Table 1 Primer sequence and product size (bp)

Gene	Primer sequence		Product size
	Forward primer	Reverse primer	
PI3K	CTCAGGGAAAGCTGGACCAC	TGGTTCAGACGAGCTTCTGTG	184
PKB	ACTCATTCCAGACCCACGAC	CCGGTACACCACGTTCTTCT	176
GLUT4	CCCACAGAAAGTGATTGAACAG	AGAGAGCCCAAAGGGTAGTGG	110
GLUT2	CCAGCACATACGACACCAGACG	CCAAAGAACGAGGCGACCAT	125
CB1	CTGAGGAGCAAGGACCTGAGAC	GTTGTTGGCGTGCTTGTC	210
β -actin	TCGTACCACTGGCATTGTGAT	CGAAGTCTAGGGCAACATAGCA	233

1.7 统计学处理

采用 SPSS 22.0 和 Origin 9.0 进行统计分析, 以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 结果采用 Duncan 显著性差异检验进行单因素方差分析, 显著水平是 0.05。

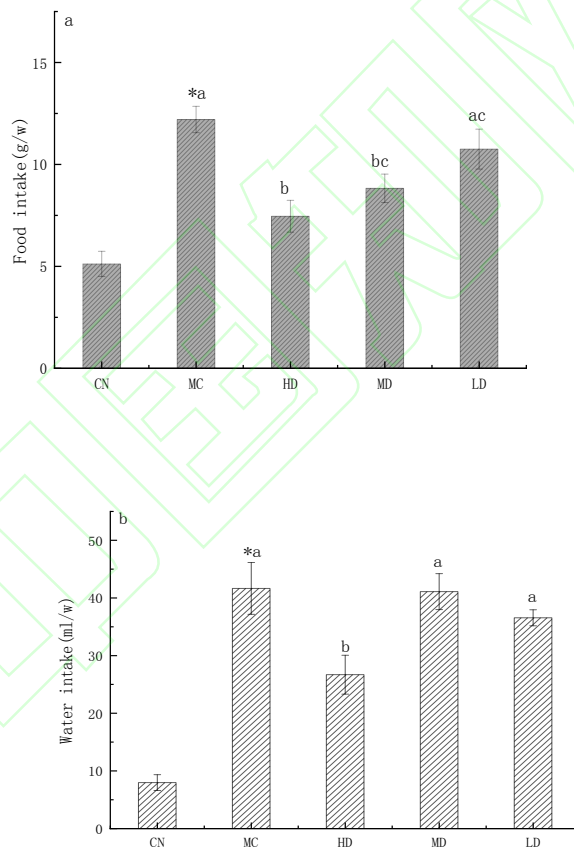
2 结果与分析

2.1 花椒精油的提取和性状

花椒精油是指具有一定气味的挥发性油性液体物质，可以用蒸汽蒸出，是花椒次生代谢产物的来源^[25]，也是花椒香气的主要组成成分^[26]，为无色或浅黄色油状液体，青椒或红椒提取的花椒精油均具其典型芳香味，且无麻味，但青椒精油苦味明显大于红椒精油。本次实验使用的红花椒精油，陕西韩城产大红袍花椒经超临界 CO₂ 萃取后，用分子蒸馏分离而得，由贵州玄德生物科技股份有限公司提供。

2.2 花椒精油对糖尿病小鼠摄食量、饮水量及体重的影响

各组小鼠给药期间自由摄食、自由饮水。糖尿病的典型症状是“三少一多”，即摄食多、饮水多、排尿多、体重减少。由图 1a 可知，模型组的周均摄食量比空白组增加了 138.33%，存在明显差异 ($P<0.05$)，可用于判断造模成功；模型与三个剂量组之间均存在差异，其中高、中、低剂量组分别比模型组减少 38.91%、38.27%、13.51%；由图 1b 知，模型组的饮水量比空白组增加了 422.85%，存在显著差异 ($P<0.05$)，其中高、中、低剂量组分别比模型组减少 35.93%、1.31%、12.23%。体重变化可判断治疗糖尿病的药效^[27]，由图 1c 可知，在饲养期间，空白组体重显著上升，模型组因患病则体重显著下降，说明病情越来越严重，符合糖尿病病症。高、中、低剂量抑制体重减轻速率，其中高剂量组效果最明显。



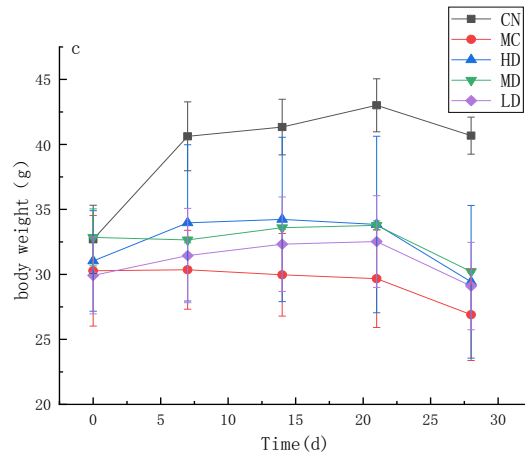


图1 小鼠摄食量、饮水量及体重的变化 (n=10)

Figure 1 Changes of Food Intake, Drinking Water Quantity and Body Weight in Mice (n=10)

注：实验数据用平均值±标准误差表示 (n=10)；*代表空白组与模型组存在显著差异 ($P < 0.05$)；不同字母表示糖尿病小鼠各组存在显著差异 ($P < 0.05$)。下同。

2.3 花椒精油对糖尿病小鼠脏器指数的影响

脏器指数是衡量机体健康生长的重要指标，灌胃花椒精油 28 d 后断颈处死迅速冰上解剖取各组组织器官精确称重，计算各组小鼠的脏器指数如表 2。各组小鼠的心脏、脾脏与空白组基本相同，差异无统计学意义。空白组肝指数、肾指数与模型组差异显著 ($P < 0.05$)，分别升高了 15.6%、42.56%，剂量组比模型组均有降低，但差异未达显著，这与陈小敏^[28]等人研究结果相一致。

表2 小鼠脏器指数 (n=10)

Table 2 Organ index of mice (n=10)

组别	脾脏 (%)	心脏 (%)	肝脏 (%)	肾脏 (%)
空白组	0.20±0.01	0.50±0.05	4.36±0.26	1.41±0.03
模型组	0.25±0.02	0.54±0.04	5.04±0.13*	2.01±0.24*
高剂量	0.26±0.09	0.54±0.05	4.73±1.26	1.89±0.34
中剂量	0.29±0.09	0.51±0.02	4.77±0.38	2.01±0.24
低剂量	0.24±0.06	0.58±0.13	4.83±0.51	1.97±0.22

2.4 花椒精油对糖尿病小鼠空腹血糖(FBG)的影响

灌胃花椒精油期间 FBG 变化如图 2。经建模后，空白组一直在正常范围内波动，而模型组血糖值一直居高不下，最高达到 33.07 mmol/L，说明糖尿病越来越严重；三个剂量组与模型组相比，FBG 显著下降，经过 28 d 治疗给药，高、中、低剂量分别下降了 28.6%、9.81%、12.57%，虽未能降到正常血糖水平，但有明显的改善作用。

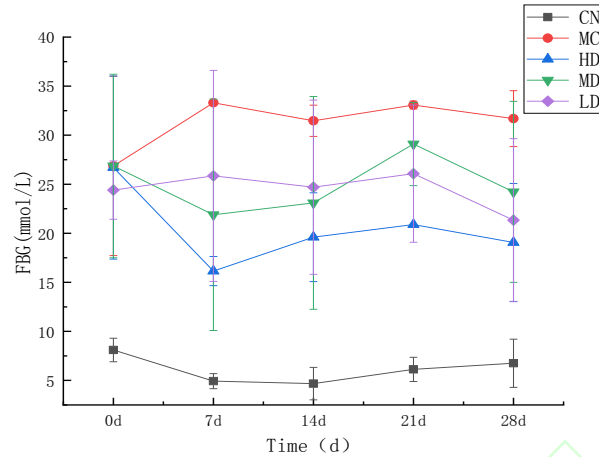
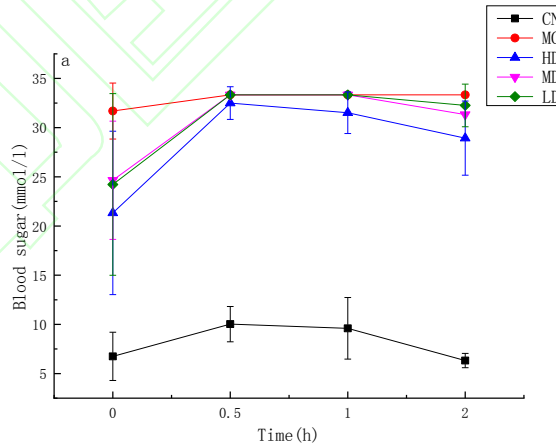


图2 小鼠空腹血糖值的变化 (n=10)

Figure 2 Changes of FBG in mice (n=10)

2.5 花椒精油对糖尿病小鼠口服糖耐量及曲线下面积 (AUC) 的影响

各组小鼠饲养 28 d 禁食不禁水 12 h, 并且根据 2.00 g/kg bw 给小鼠葡萄糖 0 h、1 h、1.5 h、2 h 血糖变化如下图。从图 3a 可以分析出, 空白组的血糖水平在给葡萄糖溶液后升高, 在 0.5 h 达到最高, 并且在体内调节 2 h 后降至正常。然而, 模型组的血糖水平在给葡萄糖溶液后 0.5 h 达到最高值后仍然很高, 这与空白组的血糖水平明显不同 ($P < 0.05$), 证明造模的成功。中、低剂量组比模型组缓慢下降, 但不显著; 高剂量组在 0.5 h 时达最高值, 到 2 h 时显著下降了 11.0%, 但都未回到初始血糖值。图 3b 显示, 模型组的葡萄糖耐量曲线下面积与空白组显著不同, 中、低剂量组降低但差异未达显著, 高剂量组和模型具有差异显著 ($P < 0.05$)。实验表明, 不同剂量的花椒精油可以在一定程度上提高 1 型糖尿病小鼠的糖耐量, 且高剂量效果显著。



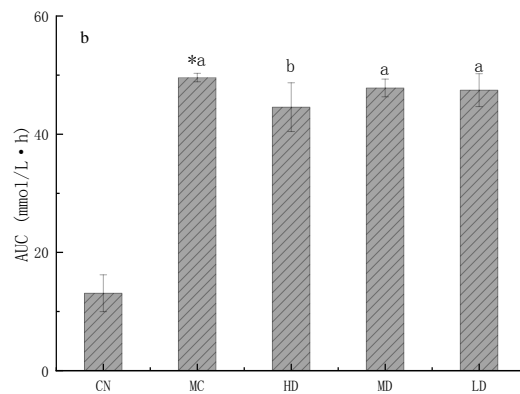


图3 小鼠糖耐量及曲线下面积的变化 (n=10)

Figure 3 Changes of glucose tolerance and area under curve in mice (n=10)

2.6 花椒精油对糖尿病小鼠糖化血红蛋白 (GHb) 与糖化血清蛋白 (GSP) 的影响

图4a显示,模型组与空白组有显著性差异($P<0.05$),模型组GHb含量比空白组显著增加443.95% ($P<0.05$),高、中、低剂量组分别比模型组下降30.76%、13.32%、3.31%,但差异未达显著;模型组GSP含量比空白组显著增加138.78%,高、中、低剂量组分别比模型组下降37.29%、22.49%、16.65%,高剂量组与模型组差异显著。

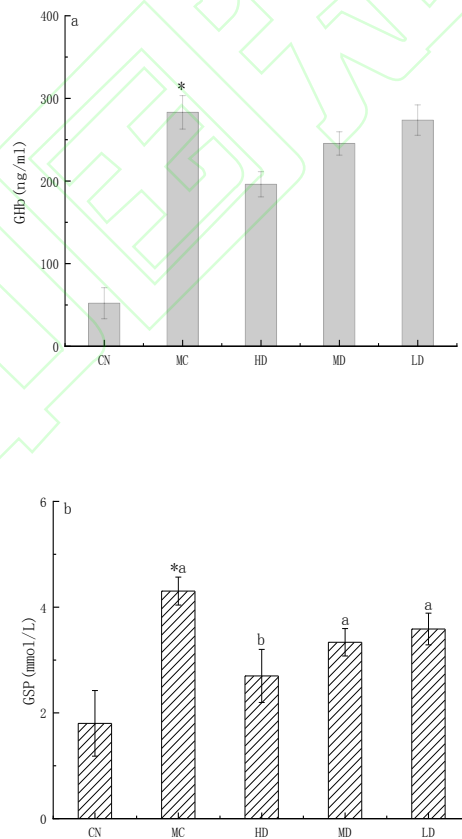


图4 小鼠糖化血红蛋白与糖化血清蛋白含量的变化 (n=10)

Figure 4 Changes of GHb and GSP in mice (n=10)

2.7 花椒精油对血清胰岛素含量 (INS) 的影响

体内能起到降糖作用的物质只有胰岛素, 其分泌状况和受体功能与糖尿病密切相关^[29]。图 5 显示模型组的胰岛素含量比空白组显著下降 16.5% ($P<0.05$), 表明模型建立成功后破坏了胰岛细胞, 使其分泌功能受到了抑制; 而高、中、低剂量分别比模型组增加了 10.29%、22.56%、13.97%。

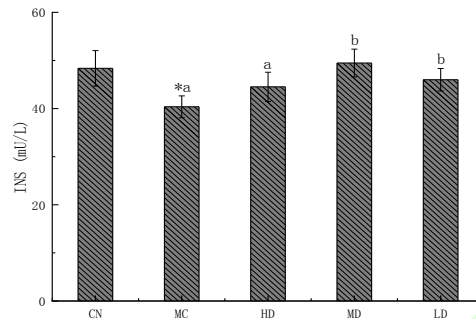


图 5 小鼠胰岛素含量的变化

Figure 5 Changes of INS in mice

2.8 花椒精油对糖尿病小鼠肝糖原与肌糖原的影响

正常人体血糖水平过高时, 会诱导胰岛素产生, 合成肝糖原和肌糖原, 降低血糖值。从图 6 可知, 模型组的肝糖原和肌糖原含量分别比空白组降低了 37.22% 和 75.0%, 三个剂量组的肝糖原和肌糖原含量较模型组均有提高, 其中高剂量组最为显著, 其肝糖原与肌糖原含量分别提高了 23.61%、149.75% ($P<0.05$)。

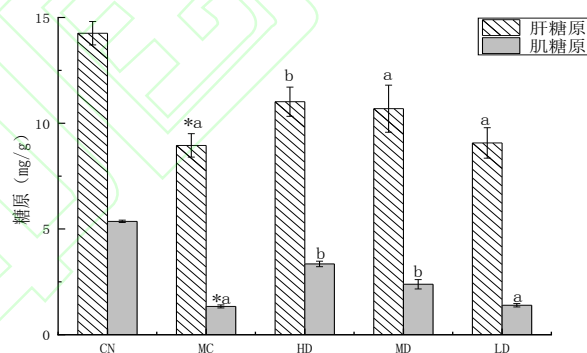


图 6 小鼠肝糖原与肌糖原的变化

Figure 6 Changes of Liver Glycogen and Muscle Glycogen in Mice

2.9 花椒精油对肝脏和骨骼肌相关基因表达量的影响。

连续灌胃花椒精油 28 d 后, 解剖小鼠取肝脏与骨骼肌, 采用实时荧光定量 PCR 测定肝脏 PI3K、PKB、GLUT 2 和骨骼肌 GLUT 4 的表达量, Western blot 检测肝脏 PI3K(p110)、PKB 和 p-PKB(Ser473) 的蛋白表达量, 结果如图 7(a,b,c), 模型组与空白组对比, 模型组 PI3K 和 PKB mRNA 和蛋白相对表达量均显著 ($P<0.05$) 下调。给药 28 d 后, 剂量组与模型组相比, 高、中、低剂量的 PI3K mRNA 表达量分别上调了 87.5%、54.7%、36.9%; PKB mRNA 表达量分别上调 53.4%、52.8%、27.7%。而对 PKB 蛋白表达量的影响不显著, 但花椒精油可显著 ($P<0.05$) 上调 PI3K (p110) 和 p-PKB (Ser473) 蛋白表达量; 高、中、低剂量组 PI3K(p110)蛋白表达量分别上调了 76.17%、71.54% 和 62.61%, p-PKB

(Ser473) 的蛋白表达量分别上调了 88.43%、85.96% 和 73.19%

图 7c 表明, 模型组的 GLUT 2 和 GLUT 4 mRNA 相对表达分别比空白组下降了 50.4%、63.4%, 而三个剂量组 GLUT 2 和 GLUT 4 mRNA 表达量分别比模型组高 77.05%、76.35%、49.22% 和 133.3%、110.8%、94.9%。

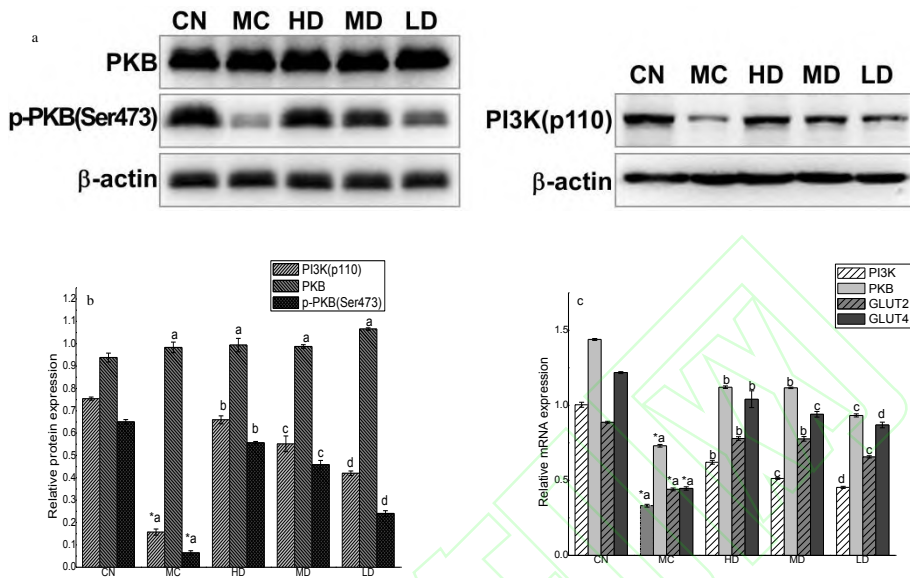


图 7 相关基因 mRNA 和蛋白表达量

Figure 7 Relative mRNA and protein expression of related genes

3 讨论

本实验采用 KM 种雄性小鼠进行试验, 有研究表明, STZ 对雄性鼠胰岛组织损伤程度强于雌性鼠, 雄性动物对 STZ 较雌性更为敏感, 造模成功率较高^[30]。STZ 是一种从链霉菌中提取的抗生素, 可特异性破坏胰岛 β 细胞, 引发胰岛的自身免疫性炎症损伤和凋亡, 胰岛 β 细胞受损导致胰岛素分泌迅速减少而血糖大幅度升高, 出现糖尿病的表现^[31]。

多饮、多尿、多食和体重减轻的“三多一少”症状及高血糖是糖尿病患者最直观的表现, 花椒精油能缓解“三多一少”的症状, 对糖尿病小鼠的摄食量、饮水量及低体重等症状具有明显的改善作用, 这与王祖哲等人发现^[32]的结果相一致。FBG 是糖尿病的基础数据, 主要反映机体胰岛素分泌能力, 是判断糖尿病的主要依据^[33], 根据国际通用的糖尿病诊断标准, 正常人空腹血糖在 3.3~6.1 mmol/L 之内, 高于 11.1 mmol/L 则被诊断为糖尿病^[34]。实验发现, 花椒精油可降低 FBG; 糖耐量是指机体对葡萄糖的耐受能力, 测定糖耐量, 可判断出胰岛素的分泌情况, 反应出糖尿病病情^[35], 实验结果显示糖尿病小鼠的糖耐量提高, 减少曲线下面积; 这与钟礼云等人^[36]的研究结果一致。

GHb 和 GSP 含量与血糖浓度成正比, 主要表示过去 4-8 周的平均血糖控制水平, 与血糖值密切相关, 糖尿病患者的 GHb 和 GSP 均高于正常人^[37], 花椒精油可降低糖尿病小鼠的 GHb 含量。胰岛素是体内唯一的降糖物质, 缺乏胰岛素就会使血糖升高, 血清胰岛素含量是糖尿病患者的重要指标^[38], 刘红芹等人^[39]发现葛根、桑叶、苦瓜、苦荞配方可降低糖化 GHb 和 GSP 水平, 而本次实验结果也显示, 三个剂量组的 GHb 和 GSP 水平较模型组均有提高。

沈玖君^[40]研究 4 种食源性植物配方对糖尿病小鼠的降糖机制表明, 植物配方根叶组、全叶组、混合粉小鼠血清胰岛素水平分别升高了 35.59%、23.6% 和 28.19%。本次实验结果也显示花椒精油可

促进胰岛素的分泌,使糖尿病小鼠的胰岛素含量增加。可初步推断花椒精油对 1-型糖尿病小鼠具有降糖效果。

现有研究表明,许多药物和植物可以影响胰岛素相关基因的表达来降低血糖^[41,42]。胰岛素通路有 PI3K/PKB 和 Ras-MAPK 途径,其 PI3K/PKB 是胰岛素信号通路的主要途径^[43,44]。GLUT2/4 是细胞吸收葡萄糖的载体, GLUT2 在肝脏中高度表达,形成葡萄糖分子通道,促进吸收合成肝糖原,肝细胞吸收 7% 的葡萄糖;而 GLUT4 在肌肉和脂肪具有高表达量,形成分子通道,使细胞能够吸收并合成肌肉糖原,肌肉细胞吸收约 70% 葡萄糖,脂肪组织细胞吸收约 7% ^[45,46,47]。当体内血糖浓度升高时,胰岛 β 细胞产生的胰岛素与其受体底物结合, PI3K 蛋白被激活并大量表达,激活后的 PI3K 又介导下游的 PKB 蛋白高表达并磷酸化,磷酸化的 PKB 蛋白诱导 GLUT2 和 GLUT4 大量表达并由细胞质转位到细胞膜,形成葡萄糖通道促进细胞吸收葡萄糖形成糖原被机体利用从而降低血糖浓度^[48,49]。结果显示,经 28 d 给药治疗,三个剂量组的肝糖原与肌糖原含量较模型组均有提高,其中高剂量组显著,这与游玉明^[50]研究结果一致。并且发现模型组的 PI3K、PKB mRNA 分别比空白组显著下调,证实了糖尿病小鼠 PI3K/PKB 胰岛素信号通路被抑制而导致高血糖,经给药治疗后,高、中、低剂量的 PI3K、PKB mRNA 和蛋白表达量比模型组分别显著上调且出现依赖剂量现象。本次实验测定肝 GLUT2 mRNA 与骨骼肌 GLUT4 mRNA 相对表达量发现,模型组的 GLUT2 mRNA 和 GLUT4 mRNA 比空白组相比有所下降并显著,而三个剂量组比模型组显著上升且差异达到统计学意义。结果表明,花椒精油对糖尿病小鼠糖代谢基因的表达有显著影响。

综上所述,花椒精油对 1-型糖尿病具有降糖作用,其可能机制是通过激活 PI3K/PKB 途径,促使 GLUT2/4 的表达,促进组织吸收葡萄糖,进而降低血糖浓度,达到治疗糖代谢紊乱的效果。

此外,本研究仅从 GLUT 膜转位的胰岛素介导的 PI3K 途径进行了研究,而对非胰岛素介导的 AMPK 途径如何,需待进一步研究。

参考文献:

- [1] 葛均波,徐永健.内科学[M].8版.北京:人民卫生出版社,2014:733.
- [2] IDF 全球糖尿病概览(第 8 版)发布[J].糖尿病文摘,2017(23):1-5.
- [3] 杨娜,张化冰,许岭翎.1 型糖尿病的非胰岛素降糖药物治疗[J].中国医刊,2019,54(04):352-355. DOI: 10.3969/j.issn.1008-1070.2019.04.002
- [4] 边甜甜,司昕蕾,曹瑞,牛江涛,李越峰.花椒挥发油提取、成分分析及药理作用研究概述[J].中国中医药信息杂志,2018,25(08):129-132. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2018.08.032
- [5] 凌智群,程宝宏,魏居国,刘茂英,潘磊.花椒功效发展的历史沿革[J].云南中医学院学报,2008(04):49-50. DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2008.04.016
- [6] 孙小文,段志兴.花椒属药用植物研究进展[J].药理学报,1996(03):231-240. DOI: 10.16438/j.0513-4870.1996.03.015
- [7] 吴素蕊,阚健全,刘春芬.花椒的活性成分与应用研究[J].中国食品添加剂,2004(02):75-78.
- [8] 赵二芳,徐未芳,刘乐,范建凤.花椒抑菌作用研究进展[J].中国调味品,2019,44(03):185-188. DOI: 10.3969/j.issn.1000-9973.2019.03.041
- [9] 边甜甜,司昕蕾,牛江涛,曹瑞,辛二旦,张爱霞,李越峰.花椒挥发油部位经清炒法炮制前后在小鼠体内的抗炎与镇痛作用[J].中国临床药理学杂志,2019,35(04):369-371+376. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2019.04.015
- [10] 王珊珊,吴昊,李梁.花椒挥发油的提取及其抑菌杀虫活性测定[J].生物技术通报,2017,33(11): 101-105. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2017-0412
- [11] 王宇,巨勇,王钊.花椒属植物中生物活性成分研究近况[J].中草药,2002,33(7):666-670.
- [12] 张惠民.花椒呈香呈味物质的研究[D].重庆:西南农业大学,1996:23-24.
- [13] You YM, Ren TY, Zhang SQ, et al. Hypoglycemic effects of Zanthoxylum alkylamides by enhancing glucose metabolism and ameliorating pancreatic dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Food Funct, 2015, 6: 3144-3154. DOI: 10.1039/c5fo00432b.
- [14] Ren TY, Zhu YP, Xia XJ, et al. Zanthoxylum alkylamides ameliorate protein metabolism disorder in STZ-induced diabetic rats[J]. Mol Endocrinol. 2017 Apr; 58(3): 113-125. Endocrinol. 2017 Apr; 58(3): 113-125. DOI: 10.1530/JME-16-0218.
- [15] Ren TY, Zhu YP, Kan JQ. Zanthoxylum alkylamides activate phosphorylated AMPK and ameliorate glycolipid metabolism in the streptozotocin-induced diabetic rats. Clin Exp Hypertens. 2017 May 17: 330-338. DOI: 10.1080/10641963.2016.1259332

- [16]陈朝军,刘芸,陆红佳,等.花椒麻素与辣椒素的不同质量比对大鼠降血脂的协同作用[J].食品科学,2014,35(19):231-235. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201419046
- [17]游玉明,任享,张世奇,等.花椒麻味物质对糖尿病大鼠肠道微生态的影响[J].营养学报,2017, 39(02):170-176. DOI: 10.13325/j.cnki.acta.nutr.sin.2017.02.016
- [18]Begorre M A, Dib A, Habchi K, et al. Microvascular vasodilator properties of the angiotensin II type 2 receptor in a mouse model of type 1 diabetes[J]. Scientific reports, 2017, 7: 45625. DOI: 10.1038/srep45625
- [19]陈小敏,谭书明,黄颖,陈萍,宋长军.刺梨、桑叶、苦瓜饮料对糖尿病小鼠的降糖作用[J].中国酿造,2019,38(06):123-127. DOI: 10.11882/j.issn.0254-5071.2019.06.023
- [20]史得君,严欢,崔清美,等.人参茎叶提取物对 I 型糖尿病小鼠模型的影响[J].食品与机械,2017,33(07):165-169. DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2017.07.036
- [21]吴贇坦,吴晓露,陈煜沛,等.经培养基优化所得牛樟芝及其功能饮料的护肝和降血糖作用[J].现代食品科技,2018,34(06):24-31+121. DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.6.004
- [22]张世奇.辣椒素对 I 型糖尿病大鼠糖代谢的影响及其降糖机制的研究[D].重庆:西南大学,2017.
- [23]鲁倩茹,黄凤玲,邵佩兰,邢珂慧,张丽芬.红枣色素对高脂饮食小鼠的降血脂作用[J].中国食品添加剂,2020,31(02):89-94.
- [24]任廷远.花椒麻素对试验大鼠蛋白质合成与分解代谢影响的机制研究[D].西南大学,2017. DOI: 10.19804/j.issn1006-2513.2020.02.008
- [25]王秋亚,景晓卉.花椒精油化学成分、提取方法及抑菌活性研究进展[J].中国调味品,2018, 43(12):187-190+195. DOI: 10.3969/j.issn.1000-9973.2018.12.037
- [26]丁涌波,罗东升,陈光静,等.花椒精油的苦味成分鉴定[J].食品科学,2017,38(24):74-80. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201724012
- [27]贾兆通,田凯华.1 型糖尿病并发代谢综合征的患病特点及其原因分析[J].中国现代医学杂志,2007(22):2770-2772+2776.
- [28]陈小敏,谭书明,黄颖,陈萍,宋长军.刺梨汁对 I 型糖尿病小鼠的降糖作用[J].现代食品科技,2019,35(08):13-20. DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.8.003
- [29]Skeldon A M, Morizot A, Douglas T, et al. Caspase-12, but Not Caspase-11, Inhibits Obesity and Insulin Resistance[J]. Journal of Immunology, 2016, 196(1): 437. DOI:10.4049/jimmunol.1501529
- [30]王晓琳,邱宗荫,夏永鹏.性别差异对实验性链脲佐菌素糖尿病大鼠造模的影响[J].第三军医大学学报,2009,31(17):1668-1671. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2009.17.006
- [31]何佳,祁珊珊,郑红星,江海,陈琛.链脲佐菌素诱导 SD 大鼠 1 型糖尿病性骨质疏松模型的建立[J].中国骨质疏松杂志,2019,25(12):1716-1720. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2019.12.010
- [32]王祖哲,马普,左爱华,孙天利,彭聪,詹龙全,王军琦,包卫洋.刺参低聚肽对糖尿病小鼠降血糖作用的研究[J].食品研究与开发,2019,40(08):85-90. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2019.08.015
- [33]杨跃杰,梁颜玲.血糖测定的意义[J].实用糖尿病杂志,2006(04):61-61.
- [34]向红丁.糖尿病的流行病学、诊断分型及防治原则[J].继续医学教育,2005(01):28-29.
- [35]孙卫芬.二甲双胍治疗糖耐量降低的临床效果和机制[J].中国实用医药,2015,10(02):142-143. DOI: 10.14163/j.cnki.11-5547/r.2015.02.100
- [36]钟礼云,林蔚,林健.苦瓜提取物降糖作用的研究[J].海峡预防医学杂志,2017,23(06):55-57.
- [37]Eldon A M, Morizot A, Douglas T, et al. Caspase-12, but Not Caspase-11, Inhibits Obesity and Insulin Resistance [J]. Journal of Immunology, 2016, 196(1):437-437. DOI: 10.4049/jimmunol.1501529
- [38]. Albers Peter H, Pedersen Andreas J T, Birk Jesper B, Kristensen Dorte E, Vind Birgitte F, Baba Otto, Nørh Jane, Højlund Kurt, Wojtaszewski Jørgen F P. Human muscle fiber type-specific insulin signaling: impact of obesity and type 2 diabetes. [J]. Diabetes, 2015, 64(2). DOI: 10.2337/db14-0590
- [39]刘红芹,张晓旭,赵婷婷,徐宝财,姜飞,王成涛,赵磊,葛根,桑叶、苦瓜、苦荞配方辅助治疗 II 型糖尿病[J].中国食品学报,2018,18(08):33-41. DOI: 10.16429/j.1009-7848.2018.08.005
- [40]沈玖君. 4 种食源性植物配方对糖尿病小鼠的降糖效果及其作用机制的初探[D].重庆:西南大学,2018.
- [41]Shuqin Li, Haixia Chen, Jia Wang, Xiuming Wang, Bo Hu, Funing Lv. Involvement of the PI3K/Akt signal pathway in the hypoglycemic effects of tea polysaccharides on diabetic mice [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 81: S0141813015006522. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.09.037
- [42]Chunjiu Ren, Yao Zhang, Weizheng Cui, Guobing Lu, Yanwen Wang, Huiju Gao, Lu Huang, Zhimei Mu. A polysaccharide extract of mulberry leaf ameliorates hepatic glucose metabolism and insulin signaling in rats with type 2 diabetes induced by high fat-diet and streptozotocin [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 72: 951-959. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.09.060
- [43]Kadowaki T. Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models [J]. J Clin Invest, 2000, 106(4): 459-465.
- [44]Czech MP, Corvera S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport [J]. J Biol Chem, 1999, 274 (4): 1865-1868. DOI: 10.1172/JCI10830.On
- [45]BRYANT N J, GOVERS R, JAMES D E. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4 [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002, 3(4): 267-277. DOI: 10.1038/nrm782
- [46]SHARAWY M H, EL-AWADY M S, MEGAHED N, et al. Attenuation of insulin resistance in rats by agmatine: role of SREBP-1c, mTOR and GLUT-2 [J]. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2016, 389(1): 45-56. DOI: 10.1007/s00210-015-1174-6
- [47]LENEY S E, TAVARE J M. The molecular basis of insulin-stimulated glucose uptake: signalling, trafficking and potential drug targets [J]. Journal of Endocrinology, 2009, 203(1): 1-18. DOI: 10.1677/JOE-09-0037
- [48]Hattem-Vaquero M, Griera M, Garc ía-Jerez A, et al. Peripheral insulin resistance in ILK-depleted mice by reduction of GLUT4 expression [J]. Journal of Endocrinology, 2017, 234: 115-128. DOI: 10.1530/JOE-16-0662
- [49]郑晓珂,王玮玮,冯卫生.胰岛素 PI3K/PKB 信号转导通路研究进展[J].中国新药杂志, 2012, 21(23): 2763-2770.
- [50]游玉明. 花椒麻味物质对大鼠糖脂代谢的影响及其分子机制的研究[D].西南大学,2016.